Eine Methode zur vollständigen Gefässdarstellung mit isotonischer Russ - Suspension

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Claus-Dieter Kopetzky

Saarbrücken

1970

Aus dem II. Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes

Direktor : Professor Dr. med. Helmut Kulenkampff

EINE METHODE ZUR VOLLSTÄNDIGEN GEFÄSSDARSTELLUNG MIT ISOTONISCHER RUSS - SUSPENSION

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Claus-Dieter Kopetzky

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent : Prof. Dr. med. H. Kulenkampff
Cor eferent : Privatdozenz Dr. G. Harbauer
Tag der mUndlichen PrUfung : 1o. November 197o

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542726_0054

EINE METHODE ZUR VOLLSTÄNDIGEN GEFÄSSDARSTELLUNG MIT ISOTONISCHER RUSS - SUSPENSION

E I N L E I T U N G

Nach PORTAL, HALLER und HYRTL hat BERENGARIUS Anfang des 16. Jh. die ersten Gefäßinjektionen vorgenommen. Die weitere Entwicklung der Injektionsverfahren zeigt, dass diese neben dem Sezieren zu den elementaren Methoden der Anatomie gehören. Bis heute gelang es nicht, bei der Niere mit ihrer überaus komplizierten Hämodynamik, auf einfache Weise eine v o l l s t ä n d i g e Gefäßinjektion zu erreichen. Letzteres wäre die notwendige Voraussetzung für die Erstellung eines Schaltplanes des Nierengefäßsystems. Vor allem ist das Kapillargebiet von außerordentlichem Interesse für die Physiologie der Diffusionsvorgänge in diesem Organ.

Es war unsere Aufgabe, die nötige Vorarbeit in Form einer histologischen Injektionstechnik zu erbringen. ROLLHÄUSER und KRITZ (1964) u.a. zeigten, dass mit der Kombination von käuflicher Tusche und künstlicher Injektion eine vollständige Gefäßdarstellung von Rattennieren möglich ist. Bei einer künstlichen Injektion gelangt das Injektionsmittel durch den Injektionsdruck an seinen Bestimmungsort. Die physiologische oder Autoinjektion benutzt die natürlichen Kräfte des lebenden Organismus, z.B. den Kreislauf des Versuchstieres. Dieses Verfahren wurde erstmals von CHRZONSZCZEWSKY (1864) zur Darstellung der Nierengefäße angewandt.

Mit der künstlichen Injektion hatten ROLLHÄUSER und KRITZ trotz unphysiologisch hoher Injektionsdrucke Schwierigkeiten, eine simultane vollständige Darstellung der Rinden- und Markkapillaren zu erhalten. Unsere Versuche mit der gleichen Methode, bei denen wir von annähernd physiologischen Druckverhältnissen ausgingen, scheiterten. Selbst die schonendsten Injektionsverfahren greifen so grob in Kreislauf und Stoffwechsel eines Organes ein, dass vermutlich mehrere Faktoren für die Unvollständigkeit der Gefäßdarstellung verantwortlich sein dürften:

1) Schädliche Eigenschaften der Tusche (Toxizität, pH-Molalität, Temperatur)

2) Eingriffe der Injektionstechnik in den lebenden Organismus, die eine allgemeine Gefäßreaktion erwarten lassen.

   a) Narkosestress
   b) Irritation des autonomen Nervensystems (Eröffnung der Leibeshöhle, Abkühlung, Austrocknung, Veränderung des Kreislaufvolumens, Bainbridge-Reflex)
   c) Mechanische Veränderungen an den Gefäßen durch unphysiologisch hohe Injektionsdrucke PFEIFER (1928)
   d) Stoffwechselveränderungen mit lokaler Gefäßschädigung. (Hypoxämie, bedingt durch Anämie, oder Anoxämie durch Isolierung eines Organes)
   e) Veränderungen des normalen Lymphstromes (Isolierung eines Organes, Ligaturen in dessen Nähe, mechanische Irritation, unphysiologische Injektionsdrucke, venöse Abflußstörungen u.a.m.)

Die Frage, welche dieser Schädlichkeiten einen Einfluß auf das Injektionsergebnis haben, ist im einzelnen nicht zu beantworten.

PFEIFER (1928) hat mit aller Klarheit darauf hingewiesen, dass nicht Art und Stärke einer Noxe für ein unvollständiges Injektionsergebnis verantwortlich sind, sondern deren Auftreten im zeitlichen Ablauf der Injektion. Er konnte zeigen, dass ein von Schädlichkeiten freier Injektionsbeginn eine hervorragende, vollständige Gefäßdarstellung ermöglicht, auch dann, wenn im weiteren Verlauf und zum Schluß der Injektion massive Noxen gesetzt werden.

PFEIFER hat zur Darstellung von ZNS-Gefäßen der Katze mit sehr gutem Erfolg eine Kombination von initialer Auto- und finaler künstlicher Injektion angewendet. Er benutzte hierzu verdünnte oder unverdünnte Scribtol-Tusche.

Nach Autoinjektionen mit dieser Tusche, die wir an Ratten durchführten, zeigten die Nieren zwar eine Darstellung der Gefäße bis ins Kapillarnetz hinein, jedoch unter völliger Aussparung von postglomerulären Kapillaren.

Da die Tiere kurz nach Beginn der Injektion unter Krämpfen starben, war es nicht möglich, eine ausreichende Menge Tusche in den Kreislauf zu infundieren. Beide Erscheinungen lassen sich zwanglos auf die unphysiologische Zusammensetzung der Scribtol-Tusche zurückführen (s.u.). Daraus ergibt sich die Forderung nach einer initial schädlickeitsfreien Injektionsmethode mit einer atoxischen Tusche.

METHODIK

1. Injektionsmittel

1.1. Tusche

Die käufliche Tusche enthält ausnahmslos einen Konservierungsstoff (Formol, Nipagin, Raschit). Die Elektrolyt-, pH- und Molalitätswerte liegen weit außerhalb des physiologischen Normbereiches. Selbst die für Injektionszwecke entwickelte " physiologische " Tusche C11 - 1431A der GÜNTHER-WAGNER PELIKAN-Werke enthält 1% Phenol (PETERSEN, 1965). Da es keine praktikable Möglichkeit gibt, diesen gefäßtoxischen Zusatz zu eliminieren, suchten wir nach neuen Wegen, eine atoxische Tusche zu gewinnen, deren Elektrolyt- und Molalitätswerte im physiologischen Bereich des Versuchstieres liegen. Dass diese Tusche speziell im Hinblick auf die Nierengefäßdarstellung nicht harnfähig sein darf, ist selbstverständlich.

Rußgemische werden schon seit längerer Zeit als Injektionsmittel verwendet. So gibt FISCHER (1791) in seiner " Anweisung zur praktischen Zergliederungskunst " allein drei Rezepte an. Im Gegensatz zu damals verfügen wir heute über ein breit gefächertes Angebot hervorragender Ruße mit den unterschiedlichsten physikochemischen Eigenschaften. Die besten Ergebnisse erzielten wir mit den Rußen Printex V[1)] und Corax B. Von diesen beiden hat Corax B den Vorteil des neutralen pH - Wertes (pH 7), im Gegensatz zu Printex V (pH 5). Wir hatten jedoch den Ein-

1)Die Firma DEGUSSA stellte uns freundlicherweise eine Reihe hochwertiger Farbruße zur Verfügung.

druck, dass gerade der letztere Ruß die besseren Injektionsbilder liefert. Der niedrigere pH-Wert wirkte sich nicht negativ aus. Ein Versuch, homologes Serum als Suspensionsmittel für Ruße zu verwenden, ergab ein unstabiles Gemisch, desgleichen physiologische Salzlösungen. Da diese ohnehin wegen der zu erwartenden Ödeme nicht infrage kamen, suchten wir nach einem geeigneten Blutersatzmittel. Macrodex® und Rheomacrodex®, für Hunde gut geeignet, verboten sich bei Ratten wegen der artspezifischen Anaphylaxiegefahr (KUSCHINSKY, G. und H. LÜLLMANN, 1967). Bei Überprüfung anderer verfügbarer Lösungen erwiesen sich Periston und Periston N als ausgezeichnete Trägersubstanzen für unsere Ruße.[1] Wie die folgende Tabelle zeigt, vermögen diese isotonischen Polyvinylpyrrolidonlösungen (PVP) mindestens doppelt so viel Russ aufzunehmen wie andere getestete Flüssigkeiten.

Tabelle 1 :

Im einzelnen nehmen bis zur Einteigung auf :

Ruße :	Suspensionsmittel :	
Printex V und Corax B	Periston® und Periston N®	26 g%
	Macrodex® und Rheomacrodex®	13 g%
	Rattenserum	13 g%
	Hämaccel®	13 g%
	Ringerlösung	13 g%

1) Wir danken der Firma BAYER, Leverkusen für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen.

Die 25%ige Russ-Suspensionen in Periston und Periston N sind thixotrope Massen. Die Einteigung ist deshalb in diesem Fall, mehr als in den anderen, nur ein annähernder Grenzwert. Die Größe der einzelnen Russteilchen von Printex V liegt bei 27o Å, die von Corax B bei 455 Å, doch sind diese zu wesentlich größeren Körnchen gesintert. Ein bloßes Verrühren der Gemische führt zu keinen hinreichend stabilen Gemischen. Nach verschiedenen Versuchen gelangten wir zu folgendem Herstellungsverfahren :

a) Mechanisches Verrühren von Russ und Periston (Magnetrührer u.a.)

b) Ultrabeschallung dieses Gemisches

c) Zentrifugieren, um noch etwaige vorhandene gröbere Partikel zu sedimentieren. (15 Min. im Schwerefeld von 2ooog)

Das Verrühren hat die Aufgabe, Verklumpungen im Makrobereich aufzulösen, während dies im Mikrobereich der Ultrabeschallung zukommt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf, der eingehalten werden sollte, um eine gleichmäßig feine Suspension des Rußes in Periston zu erhalten.

Tabelle 2 :

Leistung des US - Gerätes	Glasgefäß	Plastikbeutel
6o - 25o Watt	15 - 3o Min.	3o - 4o Min.
25o - 5oo Watt	5 - 15 Min.	1o - 15 Min.

Voraussetzung ist dabei, dass immer mit dem Intensitätsmaximum beschallt wird.

Beim Zentrifugieren sollten 15 Min. bei 4800 U/Min. in einem Schwerefeld von 2000g nicht überschritten werden, da dies nur eine zusätzliche und unerwünschte Ausdünnung bewirken würde. Die Russkonzentration des angesetzten Russ- Peristongemisches lag bei unseren Versuchen zwischen 12 - 16 g%, kann aber für spezielle Zwecke bis auf 20 g% und mehr erhöht werden. In der folgenden Tabelle 3 sind die Eigenschaften der Tuschebestandteile aufgeführt.

Tabelle 3 :

Suspensionsmittel	(Nach Angaben der Fa. BAYER)
Periston^{R}	Kolloidaler, isotonischer Blutflüssigkeitsersatz enthaltend 4% Polyvinapyrrolidon (M_w 30000) in physiologischer Salzlösung
Periston N	wie oben, jedoch 6%ige PVP-Lösung mit $\overline{M}_w$ um 12600

Ruße (Nach Angaben der Fa. DEGUSSA)

	%C	%H	%S	%O	pH	Mittlere Teilchengröße
Printex	96	1,1	0,1	2,4	5	230 - 270 Å
Corax B	(keine Angaben)				7	310 - 455 Å

	Flüchtige Bestandteile	Aceton-Extrakt
Printex V	6%	1,2%
Corax B	2%	o,2%

Die mit Periston hergestellte Tusche ist, mit dem KNAUER Osmometer kontrolliert, unabhängig von der Russkonzentration isotonisch. Bei der Verwendung von Printex V liegt der pH-Wert der nicht äquilibrierten Tusche mit 3,8 etwas niedriger als bei Corax B (pH 4,5). Da dieser Wert in der Hauptsache durch den gelösten Anteil von Luft-CO_2 bedingt ist, haben wir auf die Zugabe von Puffersubstanz verzichtet.

1.2. Sterile Tusche

Auch sterile Tusche läßt sich unter Beachtung der entsprechenden Kautelen herstellen. Das Lösungsmittel in Form von Periston oder Periston N ist steril vorgegeben. Der Ruß wird im Wärmeschrank bei 15o°-18o° C entsprechend lange trocken sterilisiert. Danach wird er im abgekühlten Zustand zusammen mit Periston in sterile Plastiktüten (Verpackung von Infusionsbestecken etc.) abgefüllt und eingeschweißt. In diesen Tüten wird das Gemisch beschallt. Wir haben diese Tusche nicht mehr zentrifugiert, sondern mit gutem Erfolg sofort verwendet. Eine vollständige Sterilität läßt sich wegen der Infektion mit Luftkeimen nicht erreichen. Es empfiehlt sich deshalb die Tusche sofort nach Herstellung zu verwenden.

2. Narkose

Während für das Vorgehen nach 3.1. (s.u.) eine flache Äthernarkose ausreichte, hat sich diese bei den Methoden nach 3.2. und 3.3. nicht bewährt. Es konnte keine ausreichende Ruhigstellung erreicht werden. Wir ergänzten sie deshalb durch eine weiterführende Barbituratnarkose mit Numal^{R}. Dies applizierten wir nicht wie üblich intraperitoneal (Irritation des Peritonaeums !) sondern rectal über einen dünnen Verweilkatheter. Hiermit hatten wir den Vorteil einer guten Steuerbarkeit. Die Narkose wurde in einem abgeschlossenen Glasbehälter mit Äther eingeleitet, das narkotisierte Tier auf einem Operationstisch festgeschnallt und währenddessen die Ätherapplikation mit einer Maske weitergeführt. Im Falle einer Injektion nach 3.2. und 3.3. wird der rectale Katheter gelegt (Schlauch eines Infusionsbesteckes), die Analhaut über diesem zur besseren Abdichtung mit einer Klemme zusammengepresst und 1 ml/kg Körpergewicht der orginalen Numallösung zugeführt (FARRIS u. GRIFFITH, 1963). Hierbei empfiehlt es sich, die entsprechende Menge aus Gründen der besseren Dosierbarkeit zu verdünnen.

Nach Eintritt der Barbituratnarkose (ca. 3 - 5 Min.) wird die Ätherapplikation abgesetzt. Zur weiteren Vorbereitung gehört die Heparinisierung von Tusche und Injektionssystem. Hierzu werden der Tusche 4E Heparin/ml zugegeben (Liquemin^{R}) und die Gefäßkatheter (s.u.) mit reiner Liquaminlösung gefüllt.

3. Injektionsmethode

Nach einer Reihe von Vorversuchen führten wir Autoinjektionen in folgenden Modifikationen durch :

3.1. Autoinjektionen ohne Wahrung der Volumenkonstanz, also ausschließlich Tuscheinfusion in eine periphere Vene.

3.2. Autoinjektion in periphere Venen, unter Wahrung des Kreislaufvolumens, durch gleichzeitige gleichgroße Blutentnahme aus einer Arterie.

3.3. Autoinjektion wie unter 3.2. mit anschließender künstlicher Injektion, also Kombination von initialer Auto- und abschließender künstlicher Injektion.

Als Versuchstiere wählten wir männliche und weibliche SPRAGUE-DAWLEY Ratten, mit einem Durchschnittsalter von fünf Monaten. Als Injektionsort benutzten wir die arteria und vena femoralis. Die Injektionen wurden an narkotisierten Tieren vorgenommen.

4. Injektionstechnik

4.1. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sind folgende Hilfsmittel notwendig :

a) Ein Kleintieroperationstisch

b) Ein einschwenkbares Operationsmikroskop mit entsprechender Beleuchtung.

c) Ein Operationsbesteck, das zum Freilegen und Eröffnen kleiner Gefäße geeignet ist.

d) Ein feiner Kunststoffschlauch (Portex^{R} Nr. 48), der als Gefäßkatheter verwendet wird. Dieser findet über eine abgestumpfte Kanüle Nr. 2 Anschluß an das Schlauchsystem des Perfusors.

e) Ein Doppelperfusor (BRAUN, Melsungen), der ein gleichmäßiges Zuführen und Absaugen von Tusche und Blut auf getrennten Wegen ermöglicht.

f) Beim Vorgehen nach 3.3. wird zusätzlich ein 2-Wege-Hahn benötigt, der es erlaubt, die Tuschezufuhr statt in die Vene, in die Arterie umzuleiten.

Um eine Unterkühlung des Tieres zu vermeiden, wird die Tusche vorgewärmt. Wir haben den tuscheführenden Schlauch bis zum Gefäßkatheter in einem größervolumigen Schlauch verlaufen lassen, in dem gegensinnig zum Tuschestrom thermostatisch geheiztes, 40^{o} C warmes Wasser floß. Nachdem das narkotisierte Tier in Rückenlage an den Extremitäten festgespannt ist, beginnt man dicht unterhalb des lig. inguinale mit dem Freilegen der v. und a. femoralis einer Seite. Hier findet sich eine verzweigungsfreie Strecke, die sich für die Katheterisierung eignet. Unter dem Stereomikroskop präparierten wir die Gefäße bis auf die tunica muskularis.

Zur Kanalierung benutzten wir eine von uns entwickelte Gefäßklemme. Diese macht einen sonst kaum zu verhindernden Blutverlust unmöglich und schließt damit eine hypoxämische Schädigung mit Blutdruckabfall vor Beginn der Injektion aus. Sobald beide Katheter liegen beginnt die Injektion. (Abbildung Nr. 1 und Legende)

4.2. Beim Vorgehen nach 3.2. werden bis zu 3o ml Tusche mit einer Geschwindigkeit von 1 - 2 ml/min. in die Vene infundiert und gleichzeitig entsprechend viel Blut- Tuschegemisch aus der Arterie entnommen. Dies ist nur am lebenden Tier möglich, dessen intakter Kreislauf den Transport von der Vene zur Arterie übernimmt. Im Durchschnitt brachen wir nach 25 ml Tuschezugabe die Versuche ab, eröffneten am immer noch lebenden Tier die Leibeshöhle und extirpierten nach vorheriger Ligatur der Hili beide Nieren.

4.3. Im Falle einer Injektion nach 3.3. eröffneten wir die Leibeshöhle und klemmten die Aorta und V. Cava zwischen Herz und Abgang der Nierengefäße ab. Über den 2-Wege-Hahn führten wir weitere 15 ml Tusche in 1 1/2 Min. über die v. femoralis zu und schufen durch Eröffnung der distalen v. cava einen Abfluß. Zuvor hatten wir Ligaturen beider Nierenhili vorbereitet.
Dieser Vorgang entsprach einer zusätzlichen künstlichen Injektion beider Nieren, unter Einbeziehung aller peripher der Aortenklemme

gelegenen Durchblutungsgebiete. Die Entnahme der Nieren erfolgte wie oben.

4.4. Die alleinige Injektion 3.1. zeichnet sich durch den geringsten Aufwand aus. Wir legten hierbei die v. femoralis frei und punktierten sie mit einem " Plastik-Schädelinfusionsgerät für Neugeborene " (Dubernard, Saarbrücken Nr. 2oo). Dieses Gerät besteht aus einer feinen Kanüle mit Kunststoffgriff, die über einen dünnen Plastikschlauch mit einem Rekord-Ansatzstück verbunden ist, welches an die, mit heparinisierter Tusche gefüllte Spritze angeschlossen wird. Es empfiehlt sich zu Beginn langsam zu injizieren (max. 2 ml/Min.). Sobald das Tier eine deutliche Schwarzfärbung zeigt, kann schneller infundiert werden, bis zu 3o ml (!) Gesamtmenge. 2o ml Tusche reichen jedoch aus, um bei Ratten eine gute und vollständige Gefäßfüllung zu erreichen.
Die Überfüllung des Kreislaufes führt zu einer erheblichen Dilatation aller Gefäße. Um diese abzuschwächen, werden die Nieren erst nach Eröffnen eines größeren Gefäßes unterbunden und extirpiert.
Nach diesen drei Methoden wurden je 2o Tiere injiziert und deren Nieren wie unten beschrieben fixiert und histologisch in 2o - 4e µ dicke Serienschnitte zerlegt.

5. Histologische Technik

Beim Vorgehen nach 3.2. und 3.3. war es notwendig, die Nieren bis zum

Schneiden in toto zu behandeln, da reine Periston-Tusche nicht fixierbar ist.

5.1. Fixieren

Fixiert wird mindestens zwei Tage in Formollösung 1 : 9, in der die Organe jedoch beliebig lange verbleiben können.

5.2. Einbetten

Gelatineeinbettung nach v. APATHY (ROMEIS, 1948). V. APATHY empfiehlt zwar, die Gelatine-Lösung zu filtrieren, und anschließend zur Aufbewahrung einzutrocknen, doch haben wir uns diese Arbeit gespart. In das Nierengewebe diffundiert ohnehin nur filtrierbare Gelatine, und die Haltbarkeit kann durch Zugabe von 1 % Phenol erreicht werden. Die Lösung muß jedoch in einer Lichtschutzflasche aufbewahrt werden, da sonst durch den Phenolzusatz eine Braunfärbung erfolgt. Vor dem Entwässern im absoluten Alkohol werden die Nieren halbiert und die Schnittflächen mit flüssiger Gelatine abgedeckt.

5.3. Färben

Um jede unnötige Beanspruchung der fertigen Schnitte zu vermeiden, haben wir vor der Einbettung eine Stückfärbung mit Borax Carminlösung vorgenommen (ROMEIS, 1948).

5.4. Aufblocken

Beim Zurechtschneiden des Blockes ist darauf zu achten, dass die Nierenhälften allseits von mindestens 1 mm Gelatine umgeben sind, damit die Schnitte später sauber auf dem Objektträger haften. Wir haben auf Kunststoff, oder mit Kunststoffplättchen belegtem Holz, aufgeblockt. Dies empfiehlt sich, da Holz allein keinen genügend festen Halt gibt, zumal, wenn die Blöcke zur weiteren Verwendung in Terpineol aufbewahrt werden. Als Kleber eignen sich Technovit^{R} oder andere Zweikomponentenkleber.

5.5. Schneiden - Aufkleben - Eindecken

Zum Schneiden verwendeten wir den Tetrander I (R.JUNG, AG, Heidelberg) mit dem es uns gelang, Schnitte zwischen 1o und 1oo µm Stärke zu erhalten. Diese Schnitte wurden auf den Objektträger gebracht und mit einigen Tropfen 8o%igen Alkohols entrollt und gestreckt. Dies geschieht am besten mit zwei DUMONT-Pinzetten. Eventuelle Verklebungen lassen sich mit etwas Geduld beheben. Die Präparate sind jetzt sehr empfindlich. Eine zu rauhe Oberflächenbehandlung z.B. mit einem Pinsel zerstört sofort das sonst klare Bild der Kapillarstruktur. Hiernach brachten wir den luftgetrockneten (!) Objektträger unter gleichzeitigem Bewegen für einige Sekunden in absoluten Isopropylalkohol und von dort wieder nur einige Sekunden in Xylol. Das Eindecken erfolgte in Caedax.

Diese Präparate sind plan und sehr gut aufgehellt, wie aus den Abbildungen ersichtlich ist (Abb. 2 - 6).

ERGEBNISSE

Mit allen drei Methoden erhielten wir eine gleich gute, vollständige Injektion aller Blutgefäßabschnitte der Niere. Dies gilt auch für die übrigen Organe und Gewebe. Die Autoinjektion nach 3.1. hat aber einen entscheidenden Vorteil gegenüber den beiden anderen Methoden. Es befinden sich außer Tusche aufgehellte Blutkörperchen in den Gefäßen, wodurch es leichter fällt, Verzweigungen von Überschneidungen zu unterscheiden.

Das Ergebnis der Stückfärbung konnte dagegen nicht befriedigen. Zu starke Anfärbung oder ungenügende Differenzierung ergab unübersichtliche Bilder. Die erhoffte bessere Unterscheidungsmöglichkeit der Gefäße im Arteriolen-Venolen-Bereich wurde nicht erreicht. Die Kombination von atoxischer Tusche, Autoinjektion und schonender histologischer Technik hat ein klares vollständiges Injektionsbild der Gefäße, einschließlich des Kapillarnetzes ergeben.

DISKUSSION

Die Vorteile der von uns entwickelten Tusche im Hinblick auf ihre Teilchengröße, ihr inertes Verhalten und ihr physiologisches Suspensionsmittel sind ersichtlich.

Als einziger Nachteil kann die mangelnde Gerinnungsfähigkeit des Polyvenylpyrrolidon (PVP) während der üblichen Fixierung gelten. Dies gilt jedoch nur für die Austauschtransfusion oder die künstliche Injektion. Hier hilft Serumzugabe zur Tusche oder Ganzstückeinbettung. Bei einer Injektion nach 3.1. reicht das noch vorhandene Serum aus, die Tuschepartikel durch Eiweißfällung zu binden. Selbst Gefrierschnitte von 2o µ an aufwärts können angefertigt werden. Die besprochenen Autoinjektionen sind unseres Wissens die ersten, die mit einer atoxischen physiologischen Rußsuspension durchgeführt wurden. Inwieweit die wässrigen Aufschwemmungen zerriebener Japanischer Tusche nach TAGHUSHI (1888), GROSSER (19oo) u.a., in ihrer Substanz als " physiologisch " zu werten sind, ist fraglich. Über ihre Zusammensetzung konnten wir nichts in Erfahrung bringen, außer, dass sie Ruß enthielten. Nach den Beschreibungen von HAMBURGER (19o8), der diese Tusche in Verbindung mit Eiweiß und Serum verwendete, müssen wir eiweißfällende Zusätze annehmen. Bei entsprechender Problemstellung können wir die Periston-Rußsuspension für alle künstlichen und Auto-Injektionen empfehlen, mit einer uns bekannten Ausnahme : Beim Hund kommt es zu einer anaphylaktischen Reaktion auf das PVP (HALPERN, 1953).

Neue Aspekte können sich auf einem Gebiet mit einer ganz anderen Fragestellung ergeben, wie dem der quantitativen Messung von Tuschephagocytose bestimmter Zellen (BIOZZI et al., 1958). Es wäre zu prüfen, inwieweit der Phenolzusatz der hier verwendeten " physiologischen "

Tusche C 11 141/a GÜNTHER WAGNER, die Interpretationsmöglichkeit der Ergebnisse einengt.

Wägen wir alle drei Modifikationen der von uns durchgeführten Injektionen gegeneinander ab, so müssen wir uns für die alleinige Autoinjektion als Methode der Wahl entscheiden. Sie ist :

1. technisch einfacher zu handhaben, zeigt
2. besser zu interpretierende Bilder und gestattet
3. auch das Einbetten von Organ t e i l e n, da die Tusche nach dem Fixieren durch das geronnene Serumeiweiß in den Gefäßen festgehalten wird.

Die Wahl zwischen den beiden grundsätzlichen Injektionsarten, der künstlichen und Autoinjektion, wird am ehesten von der Problemstellung her entschieden werden.

Mit Sicherheit kann die Indikation zur Autoinjektion im Tierexperiment erweitert werden.

Für die Tuscheinjektion der Kleintierniere bedeutet sie schon jetzt eine erhebliche Vereinfachung, vergleichen wir den experimentellen Aufwand, der bisher notwendig war, ein einigermaßen vollständiges Bild zu erhalten (ROLLHÄUSER u. KRITZ, 1964). Abgesehen davon dürfen wir annehmen, dass die Niere noch während der anfänglichen Injektion annähernd physiologisch arbeiten. Bei geringerer Überfüllung und subtilerem Vorgehen kann möglicherweise ein physiologisches Zustands-

bild der Nieren erhalten werden.

Unsere histologische Technik ist nur eine Möglichkeit von vielen. Sie liefert ein sehr klares, sauberes Bild. Dies ist um so erwünschter, je feiner die Gefäße sind, die dargestellt werden sollen. Herausbröckeln von Tusche aus den größeren Gefäßen, Abbrechen von Kapillaren durch zu rauhe Oberflächenbehandlung (z.B. mit einem Pinsel etc.) und inhomogenes Einbettungsmaterial, macht das beste Injektionsergebnis zunichte. Für dickere Schnitte (1oo µm) zu Übersichtszwecken, ist das Gefrierschneiden wegen seiner Einfachheit vorzuziehen. Bei kritischer Auswahl des Paraffins (Schmelzpunkt) kann auch eine Einbettung in diesem Material vorgenommen werden. Jedoch wird hier das Aufkleben der Schnitte auf dem Objektträger problematisch, da im Gegensatz zu unserer Methode ein Abschwimmen der Schnitte während der weiteren Bearbeitung oft nicht zu verhindern ist.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Am Beispiel der Rattenniere wird diskutiert, welche Faktoren für die Schwierigkeiten verantwortlich sind, bei diesem Organ eine vollständige Gefäßdarstellung mit herkömmlichen Methoden zu erreichen.

2) Die Herstellung einer atoxischen Tusche wird mitgeteilt und die Technik dreier modifizierter Autoinjektionen geschildert, mit denen eine vollständige Gefäßinjektion der Rattenniere erreicht

werden kann.

3) An je 2o Ratten wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft.

4) Die Konstruktionsmerkmale einer neuartigen fernbedienbaren Gefäßdoppelklemme wird wiedergegeben.

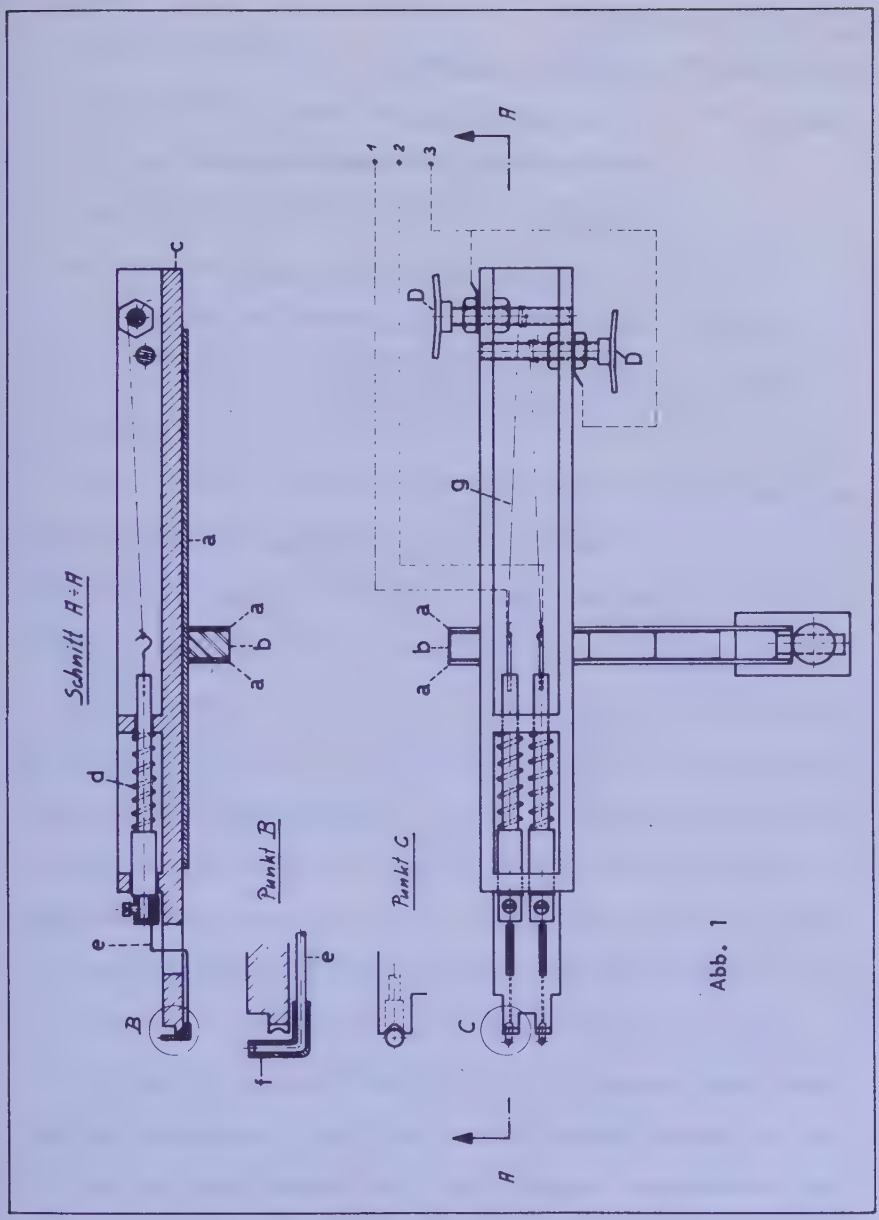

Abb. 1

LEGENDE zu Abb. 1 :

Die Zeichnung ist nicht maßstabsgerecht.

Material :

a) Weicheisenschiene
b) Dauermagnet (aus Magnetschließern)
c) Körper aus Plexiglas, mind. 5 mm stark)
d) Druckfeder
e) Stahldraht o,5 mm (Klaviersaite)
f) Kunststoffschlauch, Portex^{R} Nr. 48
g) Stahldraht (Mandolinen a - Saite)
ca. 17o mm lang je Klemme

Arbeitsweise :

An die Punkte 1 - 3 und 2 - 3 kann wahlweise eine Spannung von 6 bis 12 Volt über Potentiometer und getrennte Fußschaltung angelegt werden. Nach Schließen des Stromkreislaufes erhitzt sich der jeweilige Draht entsprechend der Stromstärke (o,7 - 1A) und gibt die Branche frei. Wird der Stromkreis unterbrochen, so kühlt sich der Dehnungsdraht ab, und schließt die Klemme (ca. 2 sec.). Die Klemmenspannung kann durch die Spannvorrichtung D, die Öffnungsweite durch Verminderung oder Erhöhung der elektrischen Spannung reguliert werden. Die Magnetdoppelschiene gewährleistet eine maximale Bewegungsfreiheit der Klemme. Die Schiene kann um ihre Längsachse und um die ihrer vertikalen Halterung gedreht werden. Vor allem bei der Bemessung des Abstandes zwischen den beiden Branchen wird von den jeweils vorgegebenen anatomischen Verhältnissen auszugehen sein. Bei unserer Klemme betrug er 6 mm.

Kanalierung :

Das präparierte Gefäß wird in die geöffneten Branchen eingelegt und diese so hintereinander geschlossen, dass eine Prallfüllung entsteht. Jetzt wird das Gefäß in Richtung der Kanalierung schräg e i n geschnitten, der freie Zipfel mit einer feinen Pinzette gefaßt und der Katheter eingeführt. Dazu ist dieser nicht flacher als 45° angeschrägt worden. Es empfiehlt sich, unter dem Mikroskop die dabei entstehende feine Spitze leicht abzurunden. Liegt die Katheterspitze sicher im Lumen, lassen wir den Gefäßwandzipfel los und streifen mit den Branchen-Innenseiten das Gefäß über den Katheter. Die hierbei geöffnete Klemmenbranche fixiert im geschlossenen Zustand sicher Katheter und Gefäß. Nach entsprechenden Ligaturen kann die Klemme entfernt und für das nächste Gefäß verwendet werden.

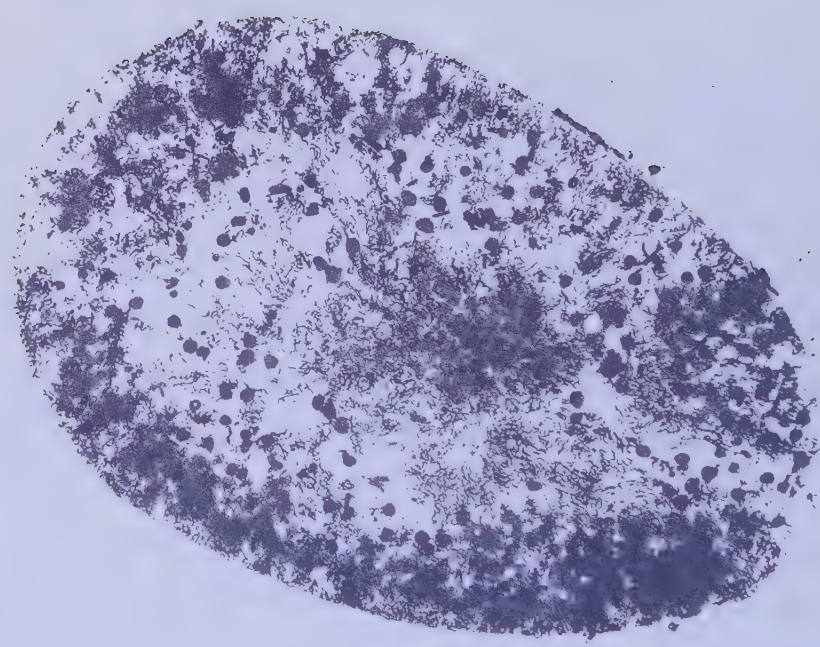

Abb. 2
Autoinjektion in eine v. femoralis mit käuflicher Scribtol-Tusche. Die Rindenkapillaren sind relativ gut gefüllt. Die meisten Ausfälle finden sich gerade in der hämodynamisch interessanten Rinden-Markgrenze. (Luminar 63)

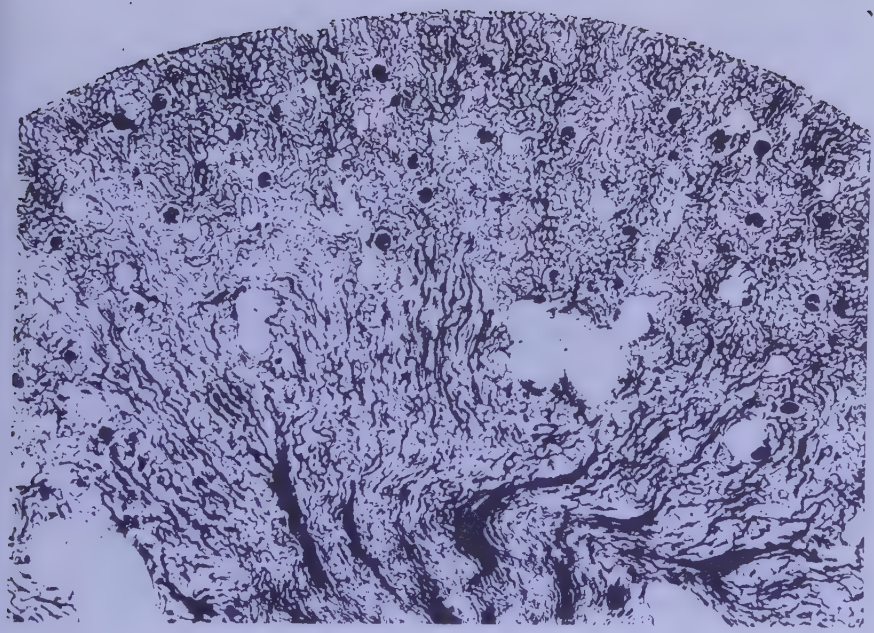

Abb. 3
Autoinjektion nach 3.1. Vollständige Injektion aller Rinden- und Markabschnitte. Gefrierschnitt 4o µ, Caedaxeindeckung.
(Luminar 63)

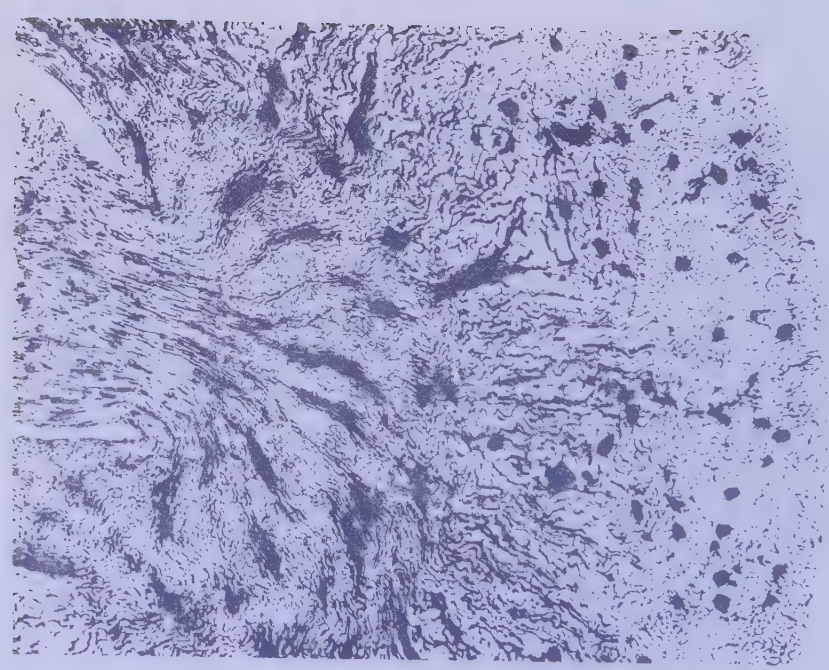

Abb. 4
Injektion nach 3.2. Vollständige Darstellung aller Gefäßabschnitte. Gelatineeinbettung nach v. APATHY. (Luminar 4o)

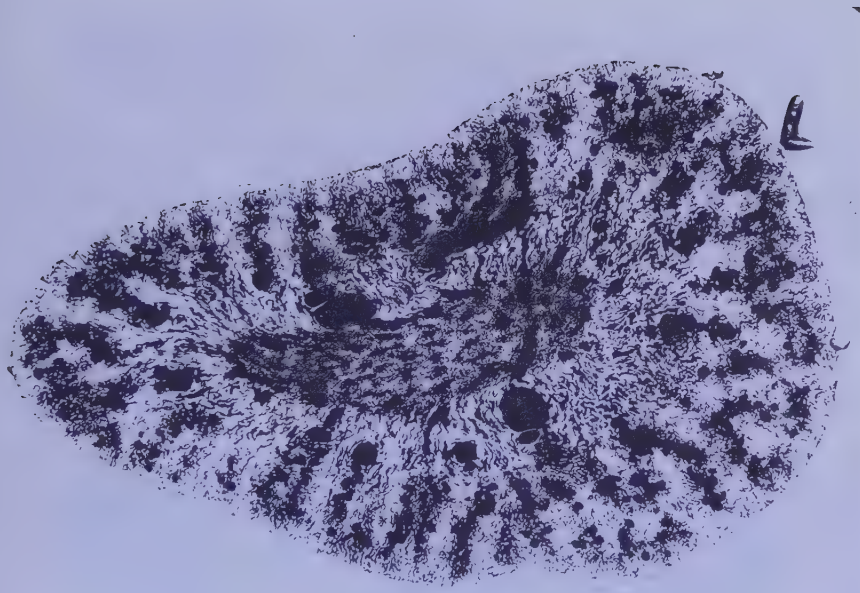

Abb. 5
Injektion nach 3.3. Auch hier sind alle Gefäßanteile dargestellt. Durch die finale künstliche Injektion sind jedoch vor allem die arteriellen Anteile stark gestaut. Oel-Gelatine-Einbettung nach v. APATHY. (Luminar 63)

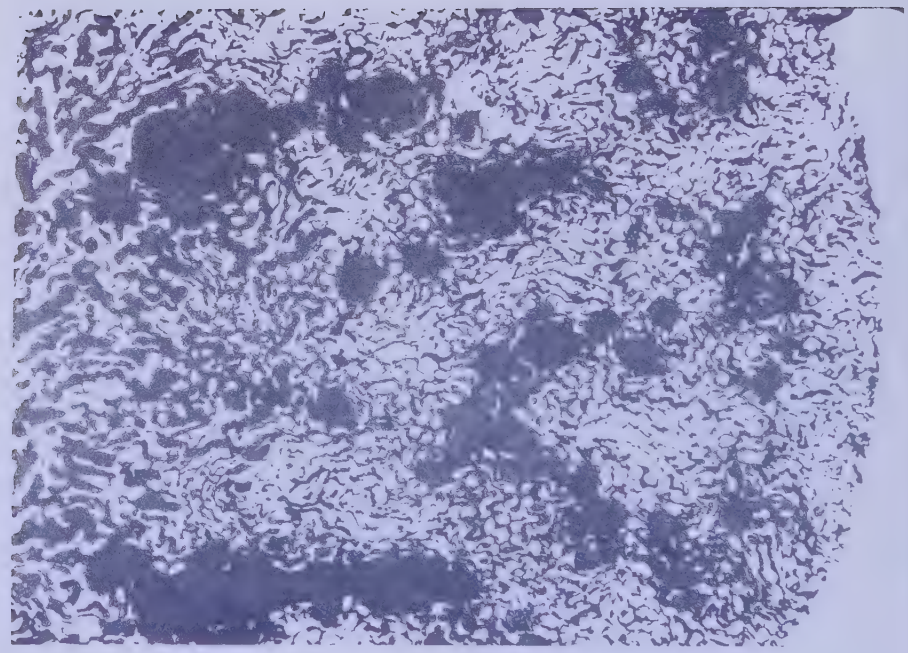

Abb. 6
Wie Abb. 5, jedoch Ausschnittvergrößerung. (Luminar 16)

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BIOZZI,G., C.STIFFEL, B.N.HALPERN et D.MOUTON — Etude de la fonction phagocytaire du S.R.E. au cours du developpment de tumeurs malignes experimentales chez le rat et la souris. Ann. Inst. Pasteur 94, 681-693, (1958)

2. CHRZONSZCZEWSKY,N. — Zur Anatomie der Niere A. path. Anat. 31, 153-199, (1864)

3. FARRIS a. GRIFFITH (edit.) — The Rat in Laboratory Investigation 2nd ed. J.B. Lippincott Company London 1963

4. FISCHER J.L. — Anweisung zur praktischen Zergliederungskunst. Leipzig 1791

5. GROSSER,O. — Mikroskopische Injektionen mit Eiweißtusche Z.wiss.Mikrosk. 17, 178-181 (19oo)

6. HALPERN,B.N., M.BRIOT — Mecanisme histaminique de l'action de la polyvinylpyrrolidone chez le chien. C.R. Soc. Bio. (Paris) 147, 643-647, (1953)

7. HAMBURGER,H.J. — Injektionen mit Eiweiß und Serumtusche zu mikroskopischen Zwecken. Z. wiss. Mikr. 25, 1-3 (19o8)

8. KUSCHINSKY,G. und H.LÜLLMANN (edit.) — Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. 3rd ed. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1967

9. PETERSON,R.A. R.K.RINGER, M.J.TETZLAFF — Ink Perfusion for Displaying Capillaries in the Chicken. Stain Technol. 4o, 351-356, (1965)

10. PFEIFER,R.A. Die Angioarchitektur der Großhirnrinde
Berlin 1928

11. ROLLHÄUSER, H. Das Gefäßsystem der Rattenniere
Z. Zellforsch. 64, 381-403 (1964)

12. ROMEIS, B. Mikroskopische Technik
15. Aufl. R. Oldenburg Verlag
München 1948

13. TAGUSHI,K. Über kalte Injektionen mit japanischer Tusche
Arch. mikr. Anat. 26, 565-567 (1888)

Herrn Professor Dr. med. H. Kulenkampff danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, sowie für die Hilfen während der Fertigstellung meiner Arbeit.

L E B E N S L A U F

Am 9. März 1941 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Heinz Kopetzky und seiner Ehefrau Margarete, geb. Borchert, in Graudenz geboren.

Während meiner Schulausbildung besuchte ich die Volksschulen in Eimke/ Kreis Ülzen, Lautenthal/ Kreis Oberharz, Wildemann/ Kreis Oberharz und die Oberschulen, Realgymnasium Robert-Koch in Clausthal-Zellerfeld, das Thomaeum in Kempen/ Niederrhein und die Fichte-Schule in Krefeld, auf der ich am 3.3.1961 mein Abitur bestand.

Im Wintersemester 1961/62 begann ich mein Medizinstudium an der Universität des Saarlandes, an der ich im Dezember 1968 mein Staatsexamen ablegte.

Meine Medizinal-Assistentenzeit absolvierte ich im Jahre 1969 an verschiedenen Krankenhäusern des Saarlandes.

Seit dieser Zeit bin ich wissenschaftlicher Mitarbeiter am pathologischen Institut der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar.